

ペプチド性化合物を用いた機能性細胞内遺伝子導入技術の開発

様々な治療用遺伝子を細胞内に導入し、先天性疾患やガン・エイズ等の後天性難治疾患を治療する遺伝子治療に関する研究が盛んに行われている。現在、遺伝子治療を目的として外来遺伝子を細胞内へ導入する方法として各種ウイルスを遺伝子キャリアーとして用いる方法が最もよく用いられており、臨床応用も始められているが、その安全性等多くの問題点を残しているのが現状である。一方、リポソームや塩基性高分子を遺伝子キャリアーとして用いる方法はウイルス法の問題点を解決できる方法として注目され、様々な分子設計がなされているが、依然ウイルス法に比べその導入効率は低いのが現状である。上記事項より、より安全かつ高効率な細胞内への核酸キャリアー（運搬体）の開発が期待されている。

これまで、我々は新規遺伝子導入用キャリアーとして、アミノ酸であるリジン残基を枝分かれ単位とするデンドリマー様ポリリジン（図 1）が培養細胞内への遺伝子キャリアーとして有効であることをこれまで明らかにしてきた。このデンドリマーをガラクトースやマンノースなどの糖で修飾することにより細胞選択的な機能的遺伝子導入が期待される。そこで本研究では、ラクトースを用いることで末端にガラクトースを有するデンドリマーを合成し、その遺伝子導入能およびプラスミド DNA との凝集体形成について解析した。

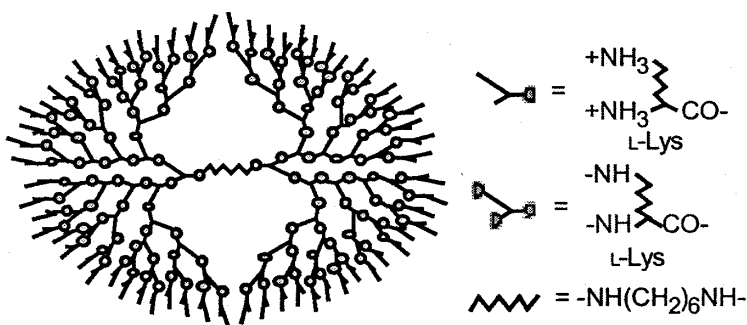


図 1、デンドリマー様ポリリジン

1、合成

デンドリマーのアミノ基とラクトースを NaBH_3CN 存在下、20 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH=7.5) 中、37°C で 1 日

あるいは 5 日間
インキュベート
することにより
ガラクトース修
飾修飾デンドリ
マーを得た（図
2）。反応の進
行はポリアクリ
ルアミド電気泳

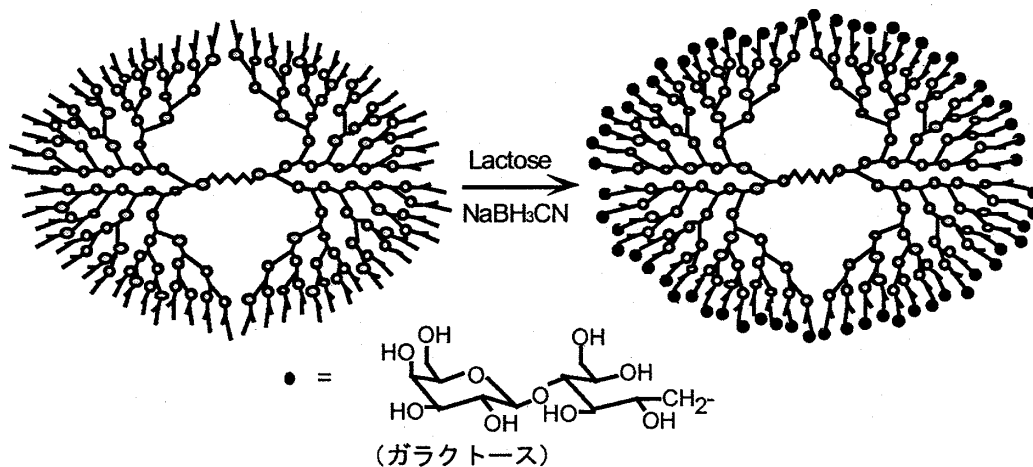


図 2、糖修飾デンドリマーの合成法

動により確認した。また、修飾率を糖の定量で算出した結果、1日間反応では末端アミノ基の35%が、5日間反応では75%が糖修飾を受けていることがわかった。

2、プラスミド DNA との結合能解析

糖修飾デンドリマーとプラスミド DNA の結合能をアガロースゲル電気泳動により解析した。その結果、チャージ比 0.25 から部分的に複合体を形成しはじめ、チャージ比 2 以上でプラスミド DNA と完全な複合体を形成した (図 3)。未修飾のデンドリマーが、チャージ比 1 以上で複合体を形成することから、糖修飾することにより結合能は若干減少することがわかった。

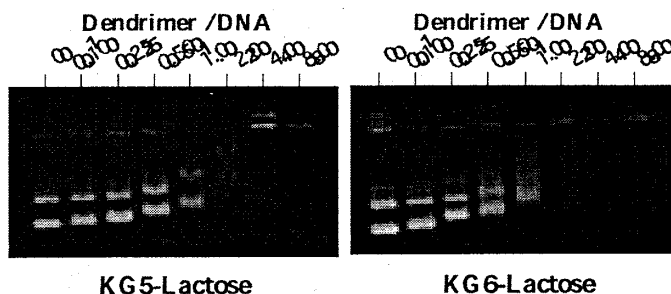


図3、アガロースゲル電気泳動

3、培養細胞への遺伝子導入能

HuH-7 (ヒト肝癌由来) 細胞に対する遺伝子導入能をレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用い評価した。デンドリマーとプラスミド DNA をチャージ比 4 で混合し、細胞に添加した。その結果、糖修飾率の増加にしたがって導入能が減少することがわかった (図 4)。

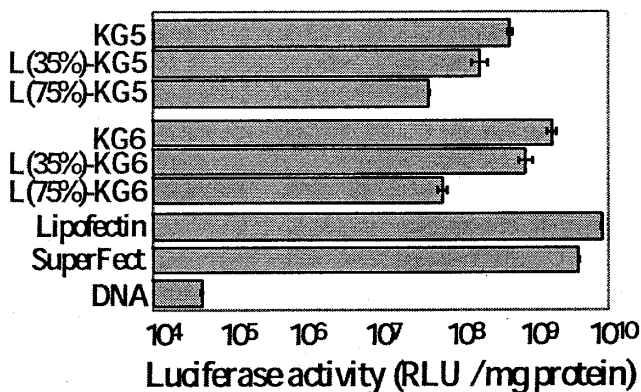


図4、糖修飾デンドリマーの遺伝子導入能

4、プラスミド DNA との凝集体形成

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) を DNA の蛍光染色剤として用い、プラスミド DNA と糖修飾デンドリマーとの凝集体形成の様子を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、未修飾のデンドリマーは球状の分散したグロビュールが観察されたのに対し、糖修飾デンドリマーで

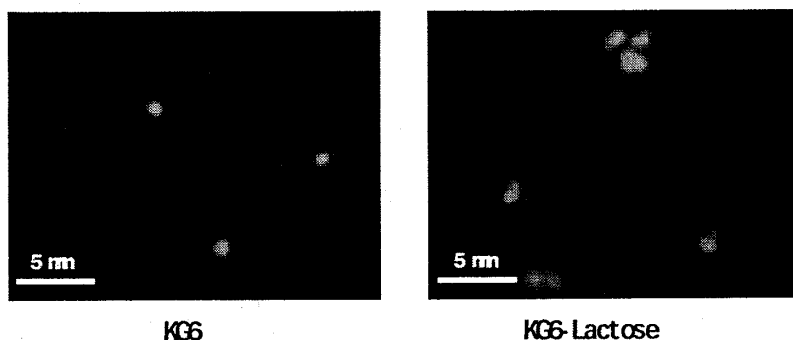


図5、蛍光顕微鏡による凝集体観察

は、そのグロビュールがさらに集まり、大きな凝集体が形成されていることが観察された (図 5)。

5、考察

今回の糖修飾では、残念ながらデンドリマーの糖修飾による期待された遺伝子導入効率の向上は認められなかった。しかし、今回の一連の結果から、糖修飾することにより形成される凝集体が大きくなることがわかり、このサイズの凝集体は細胞内へは取り込まれにくい、もしくは、取り込まれた後、発現されるまでの間に障害があることが示された。この基礎的な情報は今後の機能性遺伝子キャリアー設計のための重要な情報となり、今回得られたこのような基礎的情報を、将来目的としている遺伝子の臓器選択的デリバリーシステムの構築に役立てていきたいと考えている。

6、謝辞

本研究は（財）新世代研究所研究助成費の援助を受けて行われ、研究が滞りなく進行したことを感謝いたします。